

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 11 SEP 2000	
WIPO	PCT

10/031152  
EJU

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

DE<sup>00</sup>/02258

**Aktenzeichen:** 199 33 089.1  
**Anmeldetag:** 15. Juli 1999  
**Anmelder/Inhaber:** MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE  
MEDIZIN, Berlin/DE  
**Bezeichnung:** Mittel zur Gewebsregeneration  
**IPC:** A 61 K 38/16

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 24. August 2000  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
Im Auftrag

*Heimerl*





Anmelder: Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin

Erfinder: Dr. H. Leonhardt, Dr. M. Cardoso

### Mittel zur Gewebsregeneration

Die Erfindung betrifft ein Mittel zur Gewebsregeneration. Anwendungsgebiete dieses Mittels sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.



Mehrere Gewebe und Organe des Menschen bestehen im wesentlichen aus terminal differenzierten Zellen. Hierzu zählen unter anderem die Nervenzellen des Gehirns und die Kardiomyozyten des Herzens. Diese Zellen sind terminal differenziert, d.h. teilen sich nicht mehr und können auch nicht zur Proliferation angeregt werden. Dies bedeutet, daß beschädigte oder gar abgestorbene Zellen nicht durch proliferierende, benachbarte Zellen, wie zum Beispiel bei der Wundheilung, ersetzt werden können. Wenn z. B. bei einer Verstopfung der Koronarien Kardiomyozyten nicht ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden (Herzinfarkt), sterben betroffene Zellen ab und werden nicht durch neue Kardiomyozyten, sondern durch fibrotische Gewebe ersetzt, was zu dramatischen Funktionseinschränkungen des Herzmuskels führen kann. Diese koronaren Herzerkrankungen (KHK) sind eine der häufigsten Erkrankungen des Herzens.

---

Derzeit gibt es keine Therapiemöglichkeiten, die direkt die Ursachen behandeln, sondern nur Versuche, die Folgen des Herzinfarktes zu begrenzen. Bei schweren Fällen bleibt als letzte Option nur noch die Herztransplantation. Ziel dieser Erfindung ist es nun, terminal differenzierte Zellen wieder zur Teilung anzuregen, so daß sie zur Regeneration von geschädigtem, benachbarten Gewebe beitragen können.

---

Prinzipiell können terminal differenzierte Zellen durch Tumurviren zur Proliferation angeregt werden. Dabei kommt es aber leider zu einer irreversiblen Transformation der Zellen, d.h. eine terminal differenzierte und funktionstüchtige Kardiomyozyte wird dabei zu einer unkontrolliert wachsenden Krebszelle mutiert, die zudem die Herzmuskelfunktionen verloren hat. Dieser Ansatz ist daher für therapeutische Zwecke nicht geeignet.

Kürzlich wurde ein virales Protein, VP22 aus Herpes Simplex, beschrieben, das von infizierten Zellen exportiert und von Nachbarzellen wieder aufgenommen wird. Der genaue Mechanismus ist noch unbekannt. Der Transportprozess ist jedoch unabhängig von direkten Zell-Zell-Kontakten. Mit dem viralen Protein können auch angehängte Fremdproteine transportiert werden. (Elliott G and O'Hare P (1997) Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. Cell 88: 223-233).

A Die Erfindung hat das Ziel, ein neues Mittel zur Gewebsregeneration bereitzustellen. Ihr liegt die Aufgabe zugrunde, ein Fusionsprotein aufzubauen, welches Zellen aus geschädigten Geweben vorübergehend zur Proliferation anregt und damit die Gewebsregeneration bewirkt.

Diese Aufgabe wird mit den in den Ansprüchen dargestellten Maßnahmen gelöst.

Das erfindungsgemäße Mittel zur Gewebsregeneration umfaßt ein Mittel enthaltend ein Fusionsprotein aus einem Protein oder einer Peptidsequenz, die die Aufnahme in Zellen bewirkt, und einem die Proliferation von Zellen induzierenden Protein. Bevorzugt ist ein Fusionsprotein aus dem viralen VP22 Protein mit dem SV40 T-antigen. Aufgrund seiner vielfältigen Funktionen, die die Zellproliferation erzwingen und Apoptose verhindern, ist das SV40 T-antigen besonders für diese Aufgabe geeignet. Alternativ können T-antigen verwandte Proteine oder virale Zykline verwendet werden. Zu diesen

6

Zyklinen zählen die K- und V-Zykline des Herpesvirus. Diese Zykline werden nicht durch die Zellzyklusinhibitoren der Zelle inhibiert und können damit ungehindert die Proliferation induzieren.

Der zweite Teil der Aufgabe besteht darin, nur vorübergehend eine Proliferation zu induzieren. Nach wenigen Zellzyklen sollen die Zellen in den terminal differenzierten Ausgangszustand zurückkehren und ihre angestammte Funktion ausüben. Diese Aufgabe wird mit dem erfindungsgemäßen Mittel dadurch gelöst, daß das Mittel ein Protein ist, das sich nicht replizieren kann und von proteolytischen Enzymen abgebaut wird. Die Stabilität des Fusionsproteins kann künstlich durch den Einbau von stabilisierenden oder destabilisierenden Peptiden nach Bedarf verändert werden. Dieser Ansatz vermeidet damit irreversible genetische Veränderungen und Transformationen der Zelle, die zwangsläufig bei DNA-basierten Methoden auftreten würden.

Die Verwendung dieses Mittels erfolgt bestimmungsgemäß zur Regeneration von infarktgeschädigtem Herzgewebe und zur Regeneration von verletzungs- oder krankheitsgeschädigtem Nervengewebe. Das Mittel wird in die geschädigten Bereiche injiziert und dort von den benachbarten Zellen aufgenommen. Diese Zellen werden zur Proliferation angeregt, ersetzen die abgestorbenen Zellen und bewirken somit die Gewebsregeneration.

---

Das Mittel wird weiterhin auch bestimmungsgemäß zur Kultivierung von terminal differenzierten Zellen eingesetzt. Terminal differenzierte Zellen, wie z.B. Nervenzellen und Kardiomyozyten, können zwar ex vivo kultiviert werden aber sie proliferieren nicht und können damit nicht zu Reimplantations- oder Forschungszwecken vermehrt werden. Das erfindungsgemäße Mittel wird nach Zugabe zu dem Kulturmedium von den Zellen aufgenommen und bewirkt dann die Proliferation, d.h. Vermehrung dieser Zellen. Dabei kann je nach Bedarf die Dosierung und Zeitdauer der Behandlung

bestimmt werden. Wenn das Mittel wieder abgesetzt wird, differenzieren die Zellen wieder und können entweder reimplantiert oder zu Forschungszwecken eingesetzt werden. Es wurde gezeigt, daß das erfindungsgemäße Mittel in terminal differenzierten Skelettmuskelzellen (Myotuben) S-Phase induzieren kann

Die Erfindung soll nachfolgend durch ein Ausführungsbeispiel näher erläutert werden.

#### Ausführungsbeispiel

Das VP22 (UL49) Gen wird mit PCR aus dem Herpes Simplex Virusstamm Angelotti mit Primern amplifiziert, die den offenen Leserahmen flankieren und das Stopcodon entfernen. An den Enden dieser Primer werden BamHI und XmaI Restriktionsstellen angefügt, mit denen das PCR-Produkt direkt in einen Expressionsvektor (pEVRF, Matthias et al., 1989) kloniert werden kann. Das T-antigen Gen wird analog mittels PCR aus der SV40 DNA amplifiziert. Bei den verwendeten Primern wird jedoch eine XmaI und eine XbaI Restriktionsstelle angehängt. Das PCR-Produkt wird damit in den Expressionsvektor am C-terminalen Ende des VP22 Gens eingefügt. Im letzten Klonierungsschritt wird am C-terminalen Ende des T-antigen Gens, in der XbaI Stelle, ein Oligonukleotid eingefügt, das 6 Histidinreste (His-Tag) und ein Stopkodon kodiert. Das Endprodukt ist ein Fusionsgen bestehend aus dem VP22 Gen, dem T-antigen und einem His-Tag. Das Fusionsgen wird mit dem CMV Promoter des Expressionsvektors transkribiert und mit dem Translationssignal des Tk-Gens translatiert.

Mit diesem Expressionsvektor werden COS-7 Zellen wie zuvor beschrieben transfiziert (Leonhardt et al., 1992). Das Fusionsprotein wird aufgrund der Transporteigenschaften von VP22 aus den Wirtszellen in das Medium exportiert. Das so konditionierte Kulturmedium der transfizierten COS-Zellen wird kontinuierlich über eine Affinitätssäule (TALON, Clontech, Palo Alto, USA) gepumpt, die Fusionsproteine mit



einem Histidin-Tag spezifisch bindet. Diese Affinitätssäulen werden nach den Angaben des Herstellers verwendet. Das Fusionsprotein kann dann spezifisch mit Imidazol eluiert werden und mittels FPLC (Ionenaustauschsäulen) weiter aufgereinigt werden. Das gereinigte Fusionsprotein wird gegen physiologische Kochsalzlösung dialysiert und mittels Katether über die Koronararterien direkt in den Herzmuskel appliziert. Alternativ kann das Fusionsprotein direkt und lokal in das ischämische Herzmuskelgewebe injiziert werden.

#### Literatur

Elliott G and O'Hare P (1997) Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. Cell 88: 223-233.

Leonhardt H, Page AW, Weier HU et al (1992) A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. Cell 71: 865-873

Matthias, P, Müller, M M, Schreiber, E, Rusconi, S and Schaffner, W. (1989) Eukaryotic expression vectors for the analysis of mutant proteins. Nucl. Acids Res. 17, 6418.

---

## Patentansprüche

1. Mittel zur Gewebsregeneration, umfassend ein Fusionsprotein aus einem Protein oder einer Peptidsequenz, die die Aufnahme in Zellen bewirkt, und einem die Proliferation von Zellen induzierenden Protein
  2. Mittel zur Gewebsregeneration, umfassend ein Fusionsprotein aus dem viralen Protein VP22 mit einem die Proliferation von Zellen induzierenden Protein
  3. Mittel zur Gewebsregeneration, umfassend ein Fusionsprotein aus einem Protein oder einer Peptidsequenz, die die Aufnahme in Zellen bewirkt, mit dem SV40 T-Antigen.
  4. Mittel nach Anspruch 1, umfassend ein Fusionsprotein aus dem viralen Protein VP22 mit dem SV40 T-Antigen
  5. Mittel nach Anspruch 1, umfassend ein Fusionsprotein aus dem viralen Protein VP22 mit einem viralen Zyklin
  6. Verwendung des Mittels nach Anspruch 1-5 zur Regeneration von infarktgeschädigtem Herzgewebe
  7. Verwendung des Mittels nach Anspruch 1-5 zur Regeneration von Nervenzellen
  8. Verwendung des Mittels nach Anspruch 1-5 zur Kultivierung von terminal differenzierten Zellen
- 
9. Verwendung des Mittels nach Anspruch 8 zur ex vivo Kultivierung von z. B. Kardiomyozyten mit nachfolgender Re-implantation

## Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Mittel zur Gewebsregeneration. Anwendungsgebiete dieses Mittels sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

Das Ziel der Erfindung besteht darin, ein neues Mittel zur Gewebsregeneration bereitzustellen. Ihr liegt die Aufgabe zugrunde, ein Fusionsprotein aufzubauen, welches Zellen aus geschädigten Geweben vorübergehend zur Proliferation anregt und damit die Gewebsregeneration bewirkt.

Das erfindungsgemäße Mittel zur Gewebsregeneration umfaßt ein Mittel enthaltend ein Fusionsprotein aus einem Protein oder einer Peptidsequenz, die die Aufnahme in Zellen bewirkt, und einem die Proliferation von Zellen induzierenden Protein. Bevorzugt ist ein Fusionsprotein aus dem viralen VP22 Protein mit dem SV40 T-antigen.

---